

Relación entre calidad de ovocitos y raza de la donadora en un programa de fertilización *in vitro* en una ganadería de Marsella Risaralda

Relationship between oocyte quality and donor breed in an *in vitro* fertilization program in cattle raising of Marsella Risaralda.

María Alejandra Ángel Grisales¹, Jazmín Gómez Marulanda¹, Juan Carlos Echeverry López²

¹ Estudiante Medicina veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira. Carrera 27# 10-02 Barrio Álamos Email ma.alejaangelg@utp.edu.co, jazmin.gomez@utp.edu.co . ² Docente asesor programa de Medicina veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Tecnológica de Pereira

Resumen

La fertilización *in vitro* es la aspiración de folículos maduros presentes en los ovarios y su posterior fecundación en laboratorio. Posteriormente, estos embriones son implantados en hembras receptoras. La viabilidad de estos embriones es variable y menor a la de embriones producidos en forma tradicional. Cuando se realiza la aspiración folicular, estos ovocitos son clasificados para determinar su uso posterior. El presente trabajo buscó una relación entre la raza objeto de esta práctica y la calidad del ovocito. Para ello se tomó la información de la Hacienda El Rayado, ubicada en el municipio de Marsella, Risaralda, lugar destinado a la aspiración folicular en bovinos de diferentes razas. Se contó con la información del año 2014 al 2018 para ser analizada, donde se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos. Se encontró que el F1 (Angus x Brahman Rojo y Gyr x Holstein) obtuvo una mayor cantidad de ovocitos viables, en segundo lugar, las razas puras *Bos indicus* y en tercer lugar las razas Braford y Brangus.

Palabras claves: Aspiración folicular, biotecnología reproductiva, bovino, reproducción.

Abstract

In vitro fertilization is the aspiration of mature follicles present in the ovaries and their subsequent fertilization in the laboratory. Subsequently, these embryos are implanted in recipient females. The viability of these embryos is variable and less than that of embryos produced in the traditional way. When follicular aspiration is performed, these oocytes are classified to determine their later use. The present work looked for a relationship between the race object of this practice and the quality of the oocyte. For this purpose, information was taken from Hacienda El Rayado, located in the municipality of Marsella, Risaralda, a place for follicular aspiration in cattle of different breeds. Information from 2014 to 2018 was available for analysis, where a statistical analysis of the data obtained was carried out. It was found that F1 (Angus x Brahman Red and Gyr x Holstein) obtained a greater quantity of viable oocytes, secondly, the pure Bos indicus breeds and thirdly, the Braford and Brangus breeds.

Keywords: Follicular aspiration, reproductive biotechnology, bovine, reproduction.

Introducción

La Fertilización *in vitro* (FIV) es una biotecnología que se está incrementando cada vez más a nivel global. Consiste en aspirar ovocitos de folículos ya maduros para luego ser fecundados en el laboratorio. Posteriormente el embrión es transferido a una hembra receptora. La viabilidad de los embriones producto de FIV, es menor a la de los embriones producidos *in vivo*. Esta viabilidad disminuye cuando los embriones son criopreservados (1–3).

Con el avance en la biotecnología reproductiva en FIV, se han incrementado los esfuerzos en mejorar la viabilidad de los embriones. Se busca minimizar costos para lograr un mejoramiento genético anhelado. Es común que se realicen adaptaciones en esta tecnología para cada región. La calidad de los embriones tiene una clasificación y de esta depende los embriones implantados, el tipo de receptora para cada embrión y la calidad de su cuerpo lúteo, entre otras cosas (4).

El 40% de la producción agrícola en el mundo, está representada por la comunidad pecuaria y está a la vez aporta un gran crecimiento en la economía agrícola (5). Hoy

en día podemos encontrar diversas herramientas para el mejoramiento genético considerando la transferencia de embriones bovinos una de ellas, esta metodología ayudaría tanto a pequeños como a grandes productores, ya que esto fomentaría la productividad de sus ganaderías, en vista de que su costo no es muy elevado (6,7). En los últimos años, las hembras bovinas han sido objeto de numerosas investigaciones para un mejor aprovechamiento de sus gametos, principalmente aquellas consideradas genéticamente superiores (8,9).

La fertilización *in vitro* (FIV) es una técnica que año tras año ha venido creciendo notablemente en comparación con años anteriores, según el informe anual que nos muestra la International Embryo Technology Society (IETS) (10,11). Esta técnica ha tenido una gran demanda debido a que se ha vuelto más popular en el sector ganadero, ya que los productores han buscado alternativas como estas para el mejoramiento productivo y rentable de sus hatos (5), disminuyendo el tiempo que hay de generación en generación y buscando que cada vez se maneje una mayor calidad genética de los animales (7,8).

La FIV por medio de la aspiración folicular también ha sido utilizada para el aprovechamiento de hembras con problemas reproductivos que en la mayoría de los casos estas son descartadas, ya que no se pueden reproducir de forma natural, sin embargo se debe tener en cuenta que los problemas de estas donadoras no sean hereditarios a sus crías (7). Además esta biotecnología permite el uso de semen sexado sin comprometer sustancialmente la producción de embriones (12).

En la FIV se da una maduración artificial de los ovocitos para estos después ser fecundados en el laboratorio, de allí tendremos como resultado cigotos que pasaran por un proceso de incubación hasta que lleguen a la etapa de blastocito. Gracias a esta técnica se podrán tener embriones en diferentes estadios de su desarrollo (3,5). Esta técnica de FIV se ha dificultado por falta de métodos que permitan tener un buen parámetro de selección de ovocitos, ya que por medio de una favorable selección se podría aumentar la producción de embriones transferibles (11).

Las hembras bovinas pueden tener un promedio cercano de 4 a 5 crías durante toda su vida, estas hembras cuando nacen podrían contener 75,000 ovocitos en cada

ovario, estos se aprovecharían por medio de la FIV ya que en los sistemas convencionales como la monta natural y la inseminación artificial, solo se estaría aprovechando un pequeño porcentaje de estos ovocitos, por ende estos ovocitos inmaduros resultantes de una aspiración folicular podrían ser empleados en el laboratorio por medio de esta técnica, para utilizar animales de alto valor genético (7).

En las hembras bovinas aproximadamente el 15-30% de los ovocitos que se aspiran, podrían transformarse en embriones viables para transferir, este porcentaje podría deberse a que se utilizan ovocitos de baja calidad o de una inadecuada medida, ya que lo ideal debería ser ovocitos de 4-8 mm, descartando los de menor y mayor a estos rangos (11), en los ovarios se podrían encontrar ovocitos en diferentes etapas de su desarrollo. El ovocito es el gameto que ayuda con la mitad del genoma embrionario y en la totalidad del citoplasma del cigoto, proporcionando a estos los organelos, proteínas y demás constituyentes celulares que necesita para su desarrollo anticipado (7). La maduración de los ovocitos está brevemente fusionado a sustancias que regulan y que son producidas por los ovocito, los cuales ejecutan labores importantes en el trabajo de las células del *cumulus oophorus* (CCO) y así mismo, los constituyentes de estas células contribuyen a el crecimiento y maduración de los ovocitos (7,13).

En la actualidad se cuenta con procedimientos más modernos y exitosos, como lo son la transferencia intrafolicular de los ovocitos, esta técnica se basa en extraer de vacas donantes los ovocitos inmaduros por medio de la aspiración folicular dirigida por ultrasonografía (Ovum Pick Up: OPU) (14), seguida por la transferencia de los mismos al folículo pre-ovulatorio de una vaca previamente sincronizada (15).

En la FIV tradicional, se tienen varios criterios en cuenta para la elección de los ovocitos los cuales son la tonalidad del citoplasma, el aspecto morfológico, como la estimación del número de capas y por último y no menos importante la concentración de las células del *cumulus* (4,16). Este procedimiento permite la recuperación de ovocitos recolectados de donantes por medio de la OPU y producción de embriones de alto valor genético , pudiendo ser realizada sin mayores alteraciones en el tracto reproductivo, independiente de la fase del ciclo estral (17).

En la clasificación de los ovocitos se pretende identificar por medio de sus capas de células del *cumulus oophorus* y la homogeneidad de su citoplasma entre otras características, podemos encontrar que la clasificación puede ser cualitativa ya que varían los estándares de clasificación de ovocitos (9,15).

En la investigación realizada, de acuerdo con la información recolectada, se observa 3 tipos de clasificación para ovocitos viables dependiendo del número de capas de células del *cumulus*, color y la homogeneidad del citoplasma en la cual se podría tener en cuenta que no este compacto, sea muy traslucido, picnótico entre otras alteraciones. La clasificación tipo I consiste en más de 6 capas de células del *cumulus* y citoplasma homogéneo, la clasificación tipo II consiste en 3 a 6 capas de células del *cumulus* y/o citoplasma no tan homogéneo, la clasificación tipo III consiste en 1-3 capas de células del *cumulus* y/o citoplasma poco homogéneo. También se cuenta con una clasificación de ovocitos no viables como los ovocitos desnudos, sin *cumulus* y/o citoplasma no homogéneo (no presentan células alrededor de la zona pelúcida lo cual impide una buena capacidad de desarrollo ya que se ha demostrado que las células del *cumulus* proveen al ovocito de metabolitos como mRNA, microRNAs y moléculas de bajo peso que permiten su desarrollo normal y que el ovocito sea viable) (11,20,21), los ovocitos expandidos que son aquellos ovocitos con un alto grado de maduración, los ovocitos atrofiados que son aquellos con falta de desarrollo y los ovocitos degenerados que se consideran así por no presentar un desarrollo adecuado de las Células del *cumulus* (5).

Para esto es necesario tener en cuenta una óptima calidad de los ovocitos ya que es indispensable para obtener buenos resultados en los procesos de FIV. La maduración de los ovocitos esta brevemente ligada a sustancias reguladoras producidas por el ovocito que cumplen una función importante en la actividad de las células del *cumulus* y de la misma manera, componentes de estas células somáticas tienen participación activa en los mecanismos de maduración y crecimiento del ovocito (7,22).

La técnica de FIV se realiza con ovocitos extraídos de animales vivos u ovarios de vacas que se encuentran en mataderos, empleando para esto la OPU. Sin embargo la mayoría de estos ovocitos extraídos no se utilizan ya que pueden ser de mala calidad por ende la proporción de embriones transferibles es muy baja (4).

La aspiración folicular dirigida por ultrasonografía también conocida como Ovum Pick Up (OPU) es una técnica muy utilizada en hembras bovinas, la cual se puede realizar durante las diferentes fases del ciclo estral, en la pubertad, y en casos de animales en estado de gestación, es recomendable durante los tres primeros meses (23).

Para realizar este proceso se utilizó un equipo de ultrasonido, equipado con una sonda transvaginal micro convexa de 7,5 megahercio (MHz), ubicada en un soporte guía y una aguja de aspiración estéril (calibre 18G (Gauge) X1-1/4" (1,35x32mm), una bomba de vacío, y un circuito de aspiración conformado por una línea de aspiración folicular LA-120, con lo cual se puede asegurar un control higiénico y de calidad, así mismo realizando un lavado de la región perineal, para evitar contaminación y así proporcionar un alto grado de bioseguridad (9,15,24). Para iniciar este proceso se administró Lidocaína al 2% vía epidural, se introdujo el transductor por vía intravaginal hasta posicionarse a cualquier lado de cérvix (según ovario a puncionar), así mismo se introdujo la otra mano por vía rectal para fijar el ovario hasta la cabeza del transductor para ser visualizado en pantalla, posteriormente se ingresó la guía de punción siguiendo su trayectoria en pantalla, ubicado el folículo se empujó suavemente la aguja hasta que se aspiró su contenido y se depositó en un recipiente junto a un medio de aspiración (19).

En la FIV, como en todos los procesos existen ventajas y desventajas, las cuales ponen en duda o en acierto la utilización de esta técnica, en este procedimiento se encontró una fácil uso para su manejo en campo, pero por otro lado se encontró con unos costos de la instrumentaría muy elevados lo que hace que sea de difícil acceso a ella (23).

Sin embargo, se sabe que hay variación entre razas en muchos parámetros reproductivos y esta variación no es tan conocida en este tipo de trabajos, por ende, es necesario desarrollar estudios que determinen si la raza es determinante en el número y calidad de los ovocitos que se obtuvieron para transferencia de embriones.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la raza sobre la calidad de los ovocitos obtenidos en un programa de fertilización *in vitro* en la Hacienda El Rayado de Marsella, Risaralda.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en la Hacienda El Rayado, ubicada en el municipio de Marsella Risaralda. Posee una extensión de 830 hectáreas, de las cuales 200 están destinadas para la reforestación, con una altura de 1020 metros sobre el nivel del mar. Su topografía es de pendientes muy pronunciadas. Está destinada al sostenimiento de receptoras para programas de transferencia de embriones y a la ceba.

Con la información existente del programa presente en la finca se tomó la información de la cantidad de aspiraciones realizadas en la hacienda, teniendo en cuenta la información de los técnicos encargados sobre las aspiraciones y la clasificación empleada. Para esto se tomaron las variables Grado I (GI), Grado II (GII), Grado III (GIII), Sin *cumulus* (S/C), Expandidos (Exp), Atrofiados (Atr), Degenerados (Deg). A partir de estas variables se realizó un análisis estadístico descriptivo en Excel, con los datos recolectados inicialmente. Luego se procedió hacer un modelo lineal generalizado utilizando como variable respuesta el número de ovocitos viables y no viables, teniendo como variable predictora las razas Brangus, Braford, Gyr, Brahman Rojo y F1 (Angus x Brahman Rojo y Holstein x Gyr), para determinar cuál de las razas tiene efecto sobre estas características (tabla 1). El análisis estadístico se realizó en el software R, utilizando un nivel de significancia del 0.05.

Tabla 1: Clasificación de ovocitos.

Clasificación	Descripción
Grado I (GI)	Mas de 6 capas de células del <i>cumulus</i> , citoplasma homogéneo.
Grado II (GII)	3 a 6 capas de células del <i>cumulus</i> , citoplasma poco homogéneo.
Grado III (GIII)	1 a 3 capas de células del <i>cumulus</i> , citoplasma poco homogéneo.

Sin <i>cumulus</i> (S/C)	No presenta células del <i>cumulus</i> alrededor de la zona pelúcida, citoplasma no homogéneo.
Expandidos (Exp)	Ovocitos con un alto grado de maduración.
Atrofiados (Atro)	Ovocitos con falta de desarrollo.
Degenerado (Deg)	Desarrollo inadecuado de células del <i>cumulus</i> .

Resultados

En total se contó con la información de 106 vacas donadoras de las razas Brangus, Braford, Gyr, Brahman rojo y F1, a las que se le realizaron 461 aspiraciones durante el periodo 2014 – 2018 (gráfico 1).

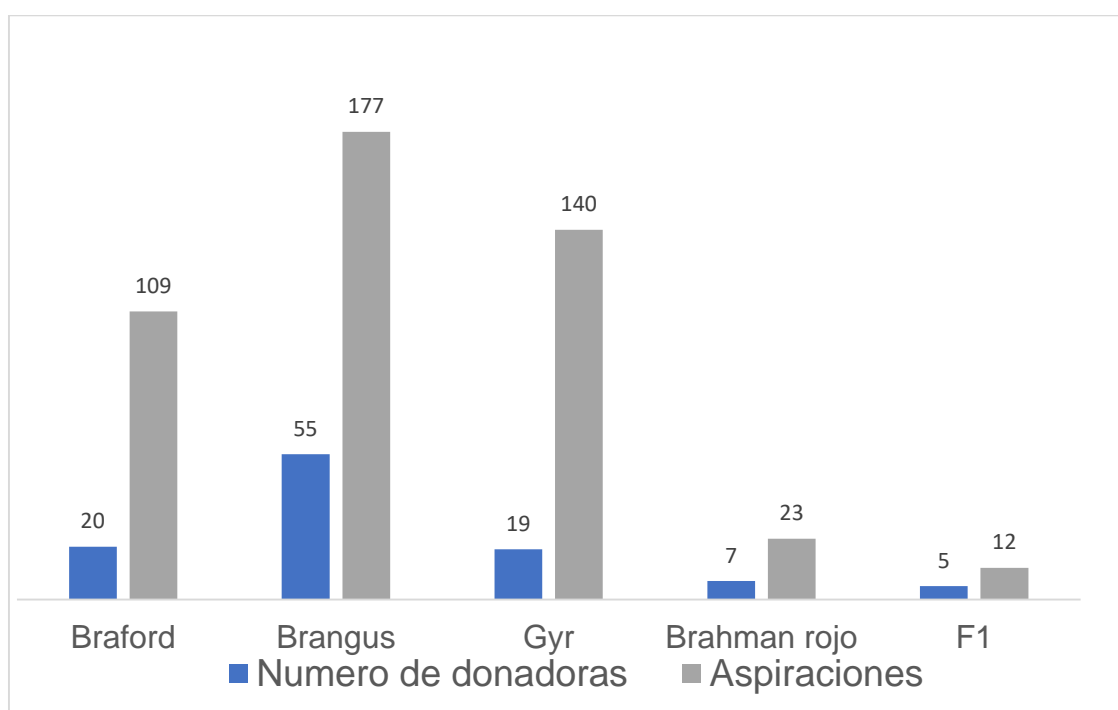


Gráfico 1: Correlación de las razas de las donadoras frente a la cantidad de aspiraciones.

En el gráfico 1 se pudo observar que la raza con mayor número de donadoras y aspiraciones fue la raza Brangus y la raza clasificada como F1 fue la de menor cantidad tanto de donadoras como de aspiraciones.

De acuerdo a las aspiraciones realizadas se hizo una clasificación de ovocitos según su morfología. En la siguiente tabla se clasifico en ovocitos viables y no viables, donde los viables se clasificaron de acuerdo con un orden de calidad, en el que la mejor es la Grado I, seguida por la Grado II y finalizando con la Grado III. Los ovocitos no viables

se clasificaron en S/C (sin *cumulus*), Exp (Expandido), Atro (Atrofiado) y Deg (Degenerado).

Tabla 2: Resumen de los datos obtenidos de las 461 aspiraciones.

Raza	Ovocitos viables	Ovocitos no viables	Ovocitos totales	Grado I	Grado II	Grado III	S/C	Exp	Atro	Deg
Braford	3.650	1.085	4.735	105	527	3.018	370	307	61	347
Brangus	4.638	1.121	5.759	115	736	3.787	240	267	44	570
Gyr	3.210	733	3.943	166	571	2.473	216	255	26	236
Brahman rojo	773	164	937	57	154	562	52	27	11	74
F1	348	58	406	11	45	292	11	6	4	37
Total	12.619	3.161	15.780	454	2.033	10.132	889	862	146	1.264

En la tabla 2 se pudo observar que la raza con mayor producción tanto de ovocitos viables, no viables y totales fue la raza Brangus. En la clasificación de ovocitos viables la raza Gyr obtuvo la mayor producción de ovocitos Grado I y la raza Brangus una mayor producción de ovocitos Grado II y Grado III.

Se pudo percibir en la clasificación de ovocitos no viables, que la mayor raza que produjo ovocitos Sin *cumulus* fue la raza Braford, donde también fue la mayor productora de ovocitos expandidos y atrofiados, la raza Brangus fue la mayor productora de ovocitos degenerados.

A la clasificación de ovocitos tanto viables como no viables, se le realizó un análisis estadístico descriptivo como lo podemos observar en la tabla 3.

Tabla 3: Análisis estadístico descriptivo de los datos.

Características	Raza	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Coficiente de variación	Máximo	Mínimo
Grado I	Gyr	4% **	0,06	0,29	143,68	30%	0%
	Brangus	2%	0,05	0,314	217,54	27%	0%
	Braford	2%	0,03	0,229	175,41	12%	0%
	Brahman R	6% ***	0,11	0,453	185,04	45%	0%
	F1	3%	0,02	0,134	81,55	5%	0%
Grado II	Gyr	14%	0,11	0,29	79,77	57%	0%
	Brangus	12%	0,11	0,314	92,65	52%	0%
	Braford	11%	0,09	0,287	87,72	34%	0%
	Brahman R	17% *	0,15	0,387	95,11	79%	0%
	F1	11%	0,08	0,302	75,97	34%	5%
Grado III	Gyr	63%	0,16	0,201	25,33	95%	17%
	Brangus	64%	0,15	0,189	23,65	91%	0%
	Braford	65%	0,13	0,157	19,57	94%	27%
	Brahman R	58%	0,2	0,271	35,51	80%	0%
	F1	72%	0,11	0,127	15,02	81%	39%
Sin <i>cumulus</i>	Gyr	6%***	0,06	0,245	103,36	30%	0%
	Brangus	5%***	0,06	0,288	132,68	33%	0%
	Braford	10%***	0,07	0,233	75,64	36%	0%
	Brahman R	5%***	0,04	0,204	88,93	15%	0%
	F1	3%***	0,04	0,259	158,43	11%	0%
Expandido	Gyr	6% *	0,08	0,315	124,21	32%	0%
	Brangus	4%	0,07	0,328	161,64	33%	0%
	Braford	5%	0,08	0,352	160,23	34%	0%
	Brahman R	2%	0,04	0,281	179,85	13%	0%
	F1	1%	0,04	0,333	291,33	13%	0%

Atrofiado	Gyr	0% ***	0,02	0,222	219,38	9%	0%
	Brangus	1% ***	0,02	0,216	258,45	10%	0%
	Braford	1% ***	0,03	0,267	224,34	16%	0%
	Brahman R	1% ***	0,02	0,218	210,04	8%	0%
	F1	1% ***	0,02	0,204	235,27	5%	0%
Degenerado	Gyr	6%	0,08	0,304	119,98	35%	0%
	Brangus	13% ***	0,15	0,413	115,46	100%	0%
	Braford	8% *	0,09	0,314	108,79	43%	0%
	Brahman R	11% *	0,09	0,288	88,61	33%	0%
	F1	10%	0,05	0,149	46,93	18%	0%
Viabiles	Gyr	81%	0,11	0,117	12,97	100%	33%
	Brangus	78%	0,13	0,147	16,64	100%	0%
	Braford	76%	0,1	0,112	12,86	98%	43%
	Brahman R	81%	0,05	0,064	7,1	91%	67%
	F1	85% *	0,05	0,05	5,39	90%	76%
No viabiles	Gyr	19%	0,11	0,241	55,46	67%	0%
	Brangus	22%	0,13	0,273	57,74	100%	0%
	Braford	24%	0,1	0,199	40,61	57%	2%
	Brahman R	19%	0,05	0,13	29,67	33%	9%
	F1	15%*	0,05	0,120	31,14	24%	10%

*** equivale a (0,001) nivel de significancia. ** equivale a (0,01) nivel de significancia. * equivale a (0,05) nivel de significancia.

En la clasificación de ovocitos viabiles GI, GII y GIII, se pudo observar que en la clasificación GI al igual que en la GII la de mejor promedio en calidad de ovocitos fue la raza Brahman rojo y las de menor promedio en la clasificación GI fueron la raza Braford y la Brangus, obteniendo esta también el mayor coeficiente de variación en la clasificación GI respecto a las demás razas. En la clasificación GII podemos ver que la raza F1 tuvo el promedio más bajo y en la clasificación GI, GII y GIII contó con el coeficiente de variación más bajo referente a las otras razas. En la clasificación GIII la de mayor promedio fue la raza F1 y la de menor promedio fue la raza Brahman, alcanzando esta también el coeficiente de variación más alto.

En la clasificación de ovocitos no viables notamos que la raza Braford obtuvo el mayor promedio de producción de ovocitos sin *cumulus*, en cuanto a la raza de mayor producción de ovocitos expandidos fue la raza Gyr, en la producción de atrofiados no se presentó cambio entre las razas, excepto la raza Gyr la cual no tuvo producción de ovocitos atrofiados siendo la de menor promedio. El menor promedio en la clasificación sin *cumulus* y en la clasificación expandidos lo adquirió la raza F1 y en la clasificación degenerados fue la raza Gyr. La raza F1 presentó un mayor coeficiente variación en la clasificación sin *cumulus* y expandidos, así mismo fue menor en la clasificación degenerados. La raza Brangus adquirió un coeficiente de variación mayor en la clasificación. La raza Braford conto con el coeficiente de variación más bajo en la clasificación sin *cumulus* y la raza Gyr en la clasificación expandidos.

En el gráfico 2 se pueden ver los resultados de la clasificación de todos los ovocitos viables y no viables.

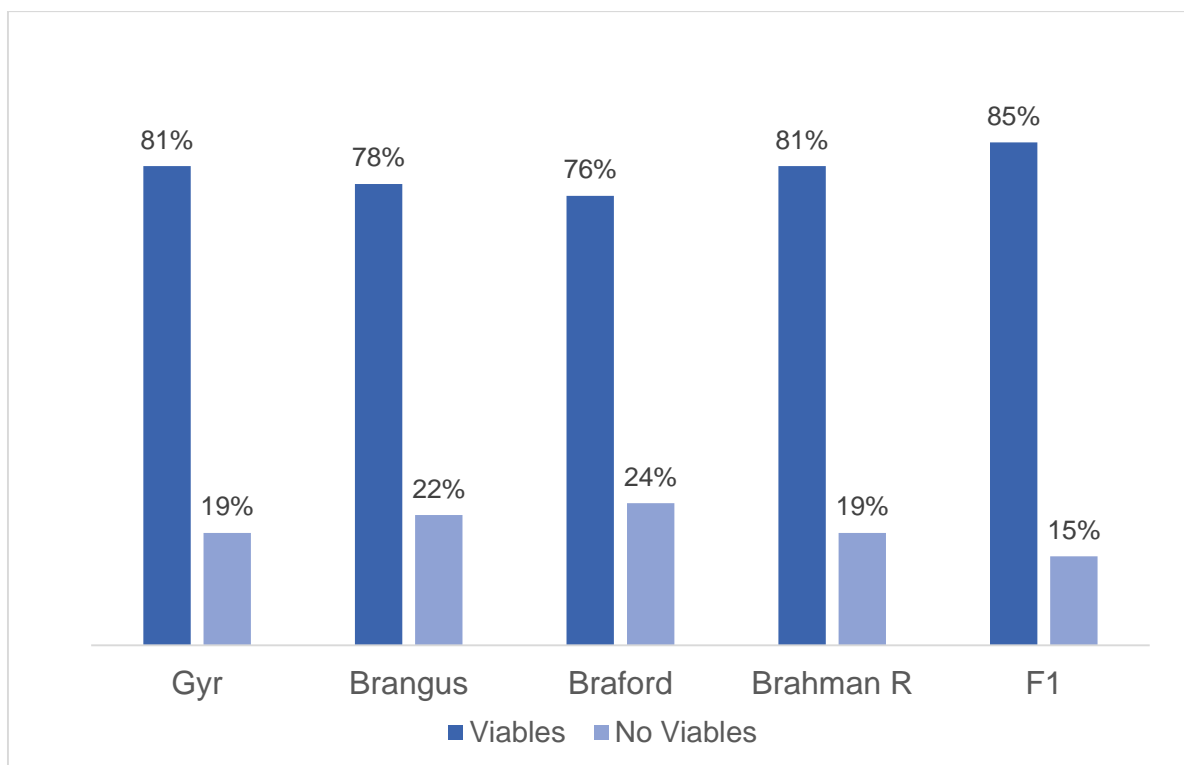


Gráfico 2: Análisis descriptivo de ovocitos viables y No viables.

En la gráfica se pudo observar que el mayor promedio de producción de ovocitos viables totales lo obtuvo la raza F1 con un 85% seguido cerca por las razas Gyr y

Brahman R ambas con un 81%, la raza con mayor producción de ovocitos No viables la obtuvo la raza Braford con un 24%, seguida por la raza Brangus con un 22%.

Discusión

En este trabajo se puede observar que, durante el proceso total de las aspiraciones, se utilizó una clasificación lo que permite saber cuales eran viables y no viables respecto a la raza y cuales de estos ovocitos son de mejor calidad. Entre los parámetros de calidad de ovocitos se tiene en cuenta la morfología ya que puede existir una relación directa con el desarrollo de estos mismos, considerando que estos parámetros son utilizados para su selección según Kuhlmann U. en 2010 (25).

La presente investigación utilizó la clasificación que se usa como norma general para trabajar posteriormente con los ovocitos, sin embargo, Urrego R, Bernal-Ulloa SM, Chavarría NA, Herrera-Puerta E, Lucas-Hahn A, Herrmann D, et al. En el 2017 enunciaron que ovocitos con atresia temprana parece tener la misma capacidad de desarrollo que los llamados viables (26), lo que podría llevar a obtener mas ovocitos aptos para trabajos reproductivos, ya que en este caso los ovocitos con atresia son descartados.

En comparación con otros trabajos apreciamos que obtuvimos mayores promedios de ovocitos por aspiración, como en el caso de Puerta Gomez LF. en 2010 (27) donde se observó que obtuvo un promedio por aspiraciones de 20.7 mientras que en el presente estudio se presentó un promedio de 34.2, igualmente obteniendo mayores resultados en las razas Gyr con un promedio de 28,1 ovocitos viables por aspiración frente a un promedio 13,13 y en la raza Brahman rojo también obteniendo este trabajo mayor promedio de producción de ovocitos viables con un 33,6 frente a un 16,06.

Conclusiones

Se ha observado una mejor respuesta en cuanto a ovocitos viables cuando los trabajos se realizan en ganado F1, esto puede deberse al vigor híbrido presentado por este cruce.

También se observa una mejor respuesta en *Bos indicus* respecto a razas que presentan algún porcentaje de *Bos taurus* tales como Brangus y Braford.

Recomendaciones

Con base en el estudio realizado, debemos tener en cuenta varios factores que influyen en la calidad y cantidad de los ovocitos, como son las variaciones entre los operadores ya que no todos los operarios presentan la misma experiencia ni el mismo criterio de clasificación, así mismo tener presente los materiales que vamos a utilizar para las aspiraciones, que estos sean los adecuados ya que en caso de un uso inadecuado de la aguja y de la presión de la bomba de vacío puede afectar la calidad de las células del *cumulus* y la calidad de los ovarios de la donadora, ya que en las aspiraciones realizadas a la donadoras las punciones van causando lesiones y al pasar el tiempo dejando cicatrices en estas. La frecuencia de las aspiraciones también es un factor a tener en cuenta por la afectación a los ovocitos en cuanto a calidad y cantidad dicho anteriormente y debe ser tenido en cuenta para futuros trabajos.

Este trabajo puede ser el inicio de mediciones más complejas como número de embriones resultantes y preñeces logradas.

Bibliografía

1. Cutini A, Teruel M, Cabodevila Y. Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Rev Taurus [Internet]. 2000;7 & 8(7000):28-39-47. Available from: <http://vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/ObstetriciaInseminacionArtificial/images/Documentos/Embrionaria.pdf>
2. Briceño YM, Cortez J V, Cayo I. Capacidad de desarrollo de ovocitos vitrificados estadio inmaduro y maduro en bovinos. 2015;5(1):24–8.
3. Bulgarelli DL, Vireque AA, Pitangui-Molina CP, Silva-De-Sá MF, De Sá Rosa-E-Silva ACJ. Reduced competence of immature and mature oocytes vitrified by Cryotop method: Assessment by in vitro fertilization and parthenogenetic activation in a bovine model. Zygote. 2017;25(2):222–30.
4. Estrella CA, Suconota AG, Ayala LE. Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. 2017;(2013):101–3.
5. Crespo J, Guamán E. Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion. Esc agrícola Panam [Internet]. 2015;35. Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4574/1/CPA-2015-027.pdf>
6. Solís Corrales A, Guerra R, Sandoya G, De Armas R. Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. Rev Electron Vet. 2012;13(10):1–16.
7. Díaz ÁMG, Bustos JEA, Ulloa SMB, Jaramillo LC. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. (Spanish). Overv Prod Bov embryos Vitro [Internet]. 2013;4(1):65–80. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=eih&AN=93681433&lang=es&site=ehost-live>
8. Loiola MVG, Chalhoub M, Rodrigues AS, Ferraz PA, Bittencourt RF, Filho A de

- LR. Validación de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Cienc Anim Bras*. 2014;15(1):93–101.
9. Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* [Internet]. 2014;81(1):138–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.008>
 10. Quintana M, Campos P, Herrera P, Gallego C, Padrón E. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras bubalus bubalis enviadas a matadero. *Rev Salud Anim* [Internet]. 2012;34(1):53–6. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000100008
 11. Vélez IC, Chica A, Urrego R, Torres V, Jimenez-Escobar C, Zambrano-Varon J. Producción in vitro de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. *CES Med Vet y Zootec* [Internet]. 2017;12(2):76–87. Available from: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/4372>
 12. Oliveira LH, Sanches CP, Seddon AS, Veras MB, Lima FA, Monteiro PLJ, et al. Short communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro embryo production in Holstein cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2016;99(11):9307–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216305719>
 13. Telles BER, Barrio J. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados Morphological Survival and meiotic progression of vitrified bovine oocytes. 2004;12(June):125–36.
 14. Hernández AG, Suárez AR, Portal LP. Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. 2012;22(1):86–97.

15. Felipe J, Sprícigo W, Alves M, Dode N. Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos. Rev Bras Reprod Anim [Internet]. 2017;41(1):25–32. Available from:
[http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p025-032\(RB630\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p025-032(RB630).pdf)
16. Nava-trujillo H. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. 2010;(August 2015).
17. Barbosa CP, Toniollo GH, Guimarães EC. Producao in vitro de embriões de bovinos da raça nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. Ciência Anim Bras [Internet]. 2013;14(1):1–7. Available from:
<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/12588>
18. Eduardo L, Guanga A. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes , luego de la estimulación ovárica con. 2017.
19. Samaniego Campoverde JX. Evaluación de ovocitos recuperados por Ovum Pick Up (OPU) en tiempos diferentes, luego de la estimulación ovárica con FSH-LH (Pluset®) en vaquillas Criollas. 2017;
20. Guemra S, Monzani PS, Santos ES, Zanin R, Ohashi OM, Miranda MS, et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. Arq Bras Med Vet e Zootec. 2013;65(6):1616–24.
21. Annes K, Soares CA, Milazzotto; M., C.B de L. Effective individual culture system for in vitro production of bovine embryos. Brazilian J Vet Res Anim Sci [Internet]. 2017;54:209. Available from: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.107721%0Ahttp://142.0.17.104>
22. Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, et al. Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation¹. Biol Reprod [Internet]. 2016;94(1). Available from:
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.114.127571>

23. Alvarado Malca AE, Gamarra G, Gallegos A, Samillan V. Tasa de recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte. An Cient [Internet]. 2016;77(1):63–8. Available from: Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Peru
24. Filipiak Y, Larocca C., M M. Comportamiento del Semen Bovino Sexado Congelado-Desconge- lado en Fertilización in vitro (FIV) Capacitado Mediante BO en dos Concentraciones versus Percoll. 2017;35(4):1337–41.
25. Kuhlmann U. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo densi- ty, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst for- mation of bovine embryos. J Mol Biol. 2000;301(5):1163–78.
26. Urrego R, Bernal-Ulloa SM, Chavarría NA, Herrera-Puerta E, Lucas-Hahn A, Herrmann D, et al. Satellite DNA methylation status and expression of selected genes in Bos indicus blastocysts produced in vivo and in vitro. Zygote. 2017;25(2):131–40.
27. Puerta Gomez LF. Aplicacion de la biotecnologia de la aspiracion folicular (OPU) y fecundacion in vitro (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernizacion del Hato Gana. 2010;60. Available from: <http://repository.lasalle.edu.co/handle/10185/6669>